

L6 ANSWER 8 OF 14 CA COPYRIGHT 2003 ACS

AN 122:128128 CA

TI Dry test reagent for blood coagulation time determination

IN Nakagawa, Mari; Kunai, Kenji

PA Tokuyama Soda Kk, Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 7 pp.

CODEN: JKXXAF

DT Patent

LA Japanese

FAN. CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 06337267	A2	19941206	JP 1994-39794	19940310
	JP 3095608	B2	20001010		
PRAI	JP 1993-71888	A	19930330		

AB The dry test reagent comprises tissue **thromboplastin**, calcium salt (CaCl<sub>2</sub>, etc.), bovine blood plasma, magnetic particles of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, saccharide (glucose, etc.), surfactant (polyoxyethylenesorbitan monooleate, etc.), amino acid (**glutamic** acid, etc.), amino acid salt (sodium **glutamate**, etc.), protein (albumin, etc.), and poly-alc. (PEG 6000, etc.). The additives are used for increasing soly. of the dry test reagent.

*Trans Dent*

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

EXAMPLE

---

[Example]

Example 1 Manufacture of the repeatability TT dryness reagent of TT dryness reagent containing an additive was performed as follows. Compound factor T KOKUSAI [International Reagents Corp. which is a commercial TT reagent; when preparing] containing a bovine brain origin tissue thromboplastin, cow adsorption plasma, and a calcium lactate according to an operation manual and considering as solution, the glucose solution prepared so that it might replace with water and the last concentration of a glucose might become 1 % of the weight was added. Furthermore, 3OFe4 particle (rare metallic company make) was added so that it might become the last concentration of 5mg/ml, the last solution for TT dryness reagents was created, and shaking stirring was improved. It poured distributively every [ 20micro / l ] to the reaction slide which shows this last solution to drawing 1 , and with the -40-degree C freezer, it froze and freeze-dried continuously. Freeze drying was performed by the method of raising temperature from -30 degrees C linearly to 20 degrees C by the vacua in 7 hours.

[0042] Measurement of TT using TT dryness reagent was performed as follows. After preparing the site roll I (normal model plasma, the Dido Baxter make) used as a sample as it was directed in the handling document, it diluted the Owren veronal buffer (sigma company make) to equivalence, in addition 1/2 concentration, and used 25microper TT dryness reagent I for measurement. TT dryness reagent saved at 4 degrees C after freeze drying was left until it became a room temperature in the desiccator, and it measured twice the coagulation time described below using CG01 [A&T Sale]. If movement of the magnetic particle after sample addition is measured as change of the scattered light, the intensity of this signal will become small rapidly according to the increase in the viscosity accompanying solidification. From immediately after sample addition, point of inflection where the attenuation speed of this signal intensity serves as the maximum was made into the congealing point, as shown in drawing 3 , after adding the sample, even this congealing point was made into the coagulation time, and the result was shown in Table 1. Moreover, signal on-the-strength maximum was also shown in Table 1. If the solubility of TT dryness reagent is high, the maximum of signal intensity will become large.

[0043] With TT dryness reagent which added the above-mentioned glucose, the repeatability at the time of measuring twice is good, and Table 1 shows that it is suitable for the use to TT measurement.

Moreover, it turns out that signal on-the-strength maximum is large, and the reagent is fully dissolving.

[0044] Example 2 By the same method as the repeatability example 1 of TT dryness reagent containing an additive, it replaced with glucose solution at the time of the last solution manufacture for TT dryness reagents, the polyoxyethylene-sorbitan-monooleate solution which is a non-ionicity surface activity-ized agent was added, and TT dryness reagent was manufactured. TT measurement with produced TT dryness reagent as well as an example 1 was performed, and the result was shown in Table 1.

[0045] With TT dryness reagent which added the above-mentioned polyoxyethylene sorbitan monooleate, the repeatability at the time of measuring twice is good, and Table 1 shows that it is suitable for the use to TT measurement. Moreover, it turns out that signal on-the-strength maximum is large, and the reagent is fully dissolving.

[0046] Example 3 By the same method as the repeatability example 1 of TT dryness reagent containing

an additive, it replaced with glucose solution at the time of the last solution production for TT dryness reagents, sodium-glutamate solution was added, and TT dryness reagent was manufactured. TT measurement with produced TT dryness reagent as well as an example 1 was performed, and the result was shown in Table 1.

[0047] With TT dryness reagent which added the above-mentioned sodium glutamate, the repeatability at the time of measuring twice is good, and Table 1 shows that it is suitable for the use to TT measurement. Moreover, it turns out that signal on-the-strength maximum is large, and the reagent is fully dissolving.

[0048] Example 4 By the same method as the repeatability example 1 of TT dryness reagent containing an additive, it replaced with glucose solution at the time of the last solution production for TT dryness reagents, BSA solution was added, and TT dryness reagent was manufactured. TT measurement with produced TT dryness reagent as well as an example 1 was performed, and the result was shown in Table 1.

[0049] With TT dryness reagent which added the above-mentioned BSA, the repeatability at the time of measuring twice is good, and Table 1 shows that it is suitable for the use to TT measurement. Moreover, it turns out that signal on-the-strength maximum is large, and the reagent is fully dissolving.

[0050] Example 5 By the same method as the repeatability example 1 of TT dryness reagent containing an additive, it replaced with glucose solution at the time of the last solution production for TT dryness reagents, PEG6000 (Wako Pure Chem; average molecular weight 7500) solution was added, and TT dryness reagent was manufactured. TT measurement with produced TT dryness reagent as well as an example 1 was performed, and the result was shown in Table 1.

[0051] With TT dryness reagent which added above PEG6000, the repeatability at the time of measuring twice is the best, and Table 1 shows that it is suitable for the use to TT measurement. Moreover, it turns out that signal on-the-strength maximum is large, and the reagent is fully dissolving.

[0052] Example 1 of comparison It is the same method as the repeatability example 1 of TT dryness reagent which does not contain an additive, an additive was not added at all at the time of the last solution production for TT dryness reagents, but TT dryness reagent was manufactured. TT measurement with produced TT dryness reagent as well as an example 1 was performed, and the result was shown in Table 1.

[0053] Table 1 shows that the repeatability at the time of measuring twice is remarkably inferior with TT dryness reagent which does not add the above-mentioned additive at all. Moreover, it turns out that signal on-the-strength maximum is very small, and a reagent is hardly dissolving. It is more difficult than the above result to use it for measurement of TT, when TT dryness reagent is created without using the additive of this invention, and it turns out that the repeatability of an usable coagulation time is shown in measurement of TT for the first time using an additive.

[0054]

[Table 1]



	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5	比較例 1
凝固時間 1 回目	72.0 (秒)	78.0	73.0	70.5	64.5	54.5
凝固時間 2 回目	70.0 (秒)	79.0	71.0	68.5	64.0	67.0
最大シグ ナル強度	5050	4800	6200	4250	5400	730

[0055] Example 6 TT dryness reagent was manufactured like the example 1 as a TT activity standard curve additive using PEG6000. The measurement sample used Homo sapiens standard plasma [International Reagents Corp. and 110% of thrombotest activity] as the TT activity 11 and 22 and 55 or 82.5% of dilution plasma with the diluent, and measured the coagulation time of each TT activity. The diluent used the solution containing 0.9% of sodium chlorides BSA5% and sucrose 10%. The

measurement result was shown in drawing 4 .

[0056] a measurement result -- drawing 4 -- like -- both -- a logarithm -- the good standard curve was obtained on the graph Therefore, it turns out that TT activity value is computable from a coagulation time by asking for a standard curve when the reagent of this invention is used.

[0057] Example 7 TT dryness reagent was manufactured like the example 1 as a factor susceptibility-test additive using PEG6000, and the Xth factor susceptibility of blood coagulation was investigated. The measurement sample was produced using normal plasma and the Xth factor lack plasma (JOJI king company) of blood coagulation. Two sorts of plasma was mixed and used so that normal plasma might be made into 100% of factor content and it might become the factor content 5, 10, and 20 and 50 or 75% by making factor lack plasma into 0% of factor content. The measurement result was shown in drawing 5 .

[0058] Drawing 5 shows that the reagent of this invention has sufficient susceptibility to the Xth factor of blood coagulation.

[0059] Example 8 TT dryness reagent was manufactured like the example 1 as a correlation additive with a conventional method using PEG6000, human plasma 38 sample was used for the measurement sample, and correlation with a conventional method was investigated. Measurement of a conventional method used KC-10 (American RUNKU) for thrombotest Owren (Eisai) according to each operation manual as a measuring device as a TT reagent. The measurement result was shown in drawing 6 .

[0060] The relation of the measuring method and conventional method using TT dryness reagent for TT measurement of this invention could be expressed as  $Y=17.4+1.45X$  from the measurement result, and the correlation coefficient at this time was 0.9903. Therefore, it turns out that TT measuring method using TT dryness reagent of this invention has the conventional TT measuring method and a very good correlation.

[0061] Example 9 The cane-sugar solution prepared so that it might replace with correlation glucose solution with a conventional method and the last concentration might become 10% of the weight was used, TT dryness reagent was manufactured like the example 1, human plasma 28 sample was used for the measurement sample, and correlation with a conventional method was investigated. Measurement of a conventional method used KC-10 (American RUNKU) for thrombotest Owren (Eisai) according to each operation manual as a measuring device as a TT reagent. The measurement result was shown in drawing 7 .

[0062] The relation of the measuring method and conventional method using TT dryness reagent for TT measurement of this invention could be expressed as  $Y=-7.954+1.653X$  from the measurement result, and the correlation coefficient at this time was 0.9900. Therefore, it turns out that TT measuring method using TT dryness reagent of this invention has the conventional TT measuring method and a very good correlation.

---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-337267

(43)公開日 平成6年(1994)12月6日

(51)IntCl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/86		7055-2 J		
C 1 2 Q 1/56		6807-4 B		

審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平6-39794

(22)出願日 平成6年(1994)3月10日

(31)優先権主張番号 特願平5-71888

(32)優先日 平5(1993)3月30日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000003182

株式会社トクヤマ

山口県徳山市御影町1番1号

(72)発明者 中川 真理

山口県徳山市御影町1番1号 徳山曹達株

式会社内

(72)発明者 九内 健志

山口県徳山市御影町1番1号 徳山曹達株

式会社内

(54)【発明の名称】 血液凝固時間測定乾燥試薬

(57)【要約】 (修正有)

【構成】 組織トロンボプラスチン、塩化カルシウム等のカルシウム塩、牛吸着血漿、四三酸化鉄粒子等の磁性粒子、並びにグルコース等の糖類、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート等の界面活性剤、グルタミン酸等のアミノ酸、グルタミン酸ナトリウム等のアミノ酸塩、BSA等のタンパク、及びPEG6000等の多価アルコールよりなる群から選ばれた少なくとも1種の添加剤を含有してなる血液凝固時間測定乾燥試薬。

【効果】 本発明によりトロンボテスト(TT)測定用のTT乾燥試薬の溶解性が向上し、同時再現性が著しく上昇した。従って、実用に適したTT乾燥試薬の提供が可能になり、手術等で抗凝固剤を投与する際に患者血液の凝固能力のモニタリングを迅速に行うことができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 組織トロンボプラスチン、カルシウム塩、牛吸着血漿、磁性粒子、並びに糖類、界面活性剤、アミノ酸、アミノ酸塩、タンパク、及び多価アルコールよりなる群から選ばれた少なくとも1種の添加剤を含有してなる血液凝固時間測定乾燥試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は臨床検査に使用されるトロンボテスト活性を測定するための血液凝固時間測定乾燥試薬に関する。

## 【0002】

【従来の技術】トロンボテスト（以下TTと略す）測定は経口抗凝血薬投与効果のモニタリングの目的で設けられた血液凝固検査項目である。

【0003】経口抗凝血薬は生体内でビタミンKの作用を阻害するため、これを投与するとビタミンKの作用によって活性化される血液凝固第II、VII、X因子等の活性が低下する。従って、経口抗凝血薬投与効果は、これらの凝固因子活性を調べれば判明するため、これらの因子活性を総合的に反映する血液凝固アッセイを行って評価を行う方法が一般に使用されている。

【0004】TTを測定した場合、その測定結果から血液凝固因子II、VII、Xの活性を総合的に判断することができる。TT試薬による測定の特長は、予め試薬に血液凝固第I及び第V因子を添加している点である。血液凝固第I及び第V因子は、経口抗凝血薬投与効果のモニタリングの際、凝固時間に本来の活性値と無関係な影響を与えるものである。しかし、TT測定は試薬にこれらの因子を予め添加することで安定に測定値を得ることができるため、モニタリングに最適である。

【0005】ところで、従来用いられてきたTTの測定法は、すべて溶液状の試薬を用いた測定法であり現在でも広く使用されている。この方法は、まず溶液状の試薬を調製し、これに血液試料を添加して反応させ、該反応液の濁度変化あるいは粘度変化をモニターして凝固を判定する方法である。その例を以下具体的に示す。

【0006】TT試薬は組織トロンボプラスチン、牛吸着血漿、カルシウム塩を含むもので、凍結乾燥品が一般に市販されている。該乾燥品TT試薬を水溶液にしたTT試薬溶液を調製しておき、予備加温しておく。次に、同じく予備加温しておいた血漿または全血に、該TT試薬溶液を混合し、添加直後から濁度変化あるいは粘度変化をモニターし、凝固するまでの秒数を測定して凝固時間を求める。上記のように求めた凝固時間がTTの凝固時間であり、経口抗凝血薬の投与で凝固因子活性が低下するに従って延長する。

【0007】一方、乾燥試薬を用いた簡便な血液凝固アッセイシステムが最近になって開発された（特表平3-504076号公報）。該アッセイシステムの原理は、

血液凝固試薬に磁性粒子を含有させた乾燥状態の試薬を作製し、該乾燥試薬に血液試料を添加し、その直後に振動磁場と静止磁場の組合せにかけて磁性粒子を運動させ、同時にこの磁性粒子の運動シグナルを光学的にモニターして凝固を検知するものである。

【0008】上記公報には、該システムを使用し、乾燥試薬中に種々の血液凝固試薬を適用した多数のアッセイ法が示されている。しかし、上記公報には乾燥試薬中の血液凝固試薬をTT試薬としたもの、即ちTT測定用の乾燥試薬及び該乾燥試薬を用いたTTの測定についての具体的な記載は全くなされていない。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】現在使用されている溶液法によるTT測定方法では、経口抗凝血薬投与効果の迅速且つ的確なモニタリングというTT測定目的に対して、試薬溶液の調製等の操作が繁雑で時間がかかること、容器や計量器の完備した場所でないといえないこと等の大きな問題点があった。また、液状試薬は保存性が悪く、全量を使用しないと経済的でないという問題点もある。ところが、乾燥試薬による測定法であれば、上記の問題点が一応解決するものと考えられた。

【0010】そこで我々は、前記公報に記載されている血液凝固アッセイ用乾燥試薬の作製方法に従って、TT測定用の乾燥試薬を以下のように試作した。即ち、TT試薬溶液に磁性粒子を添加して懸濁液とし、反応スライドに分注して凍結乾燥した。この乾燥試薬に血漿を滴下し、凝固時間の測定を試みたところ、凝固時間の再現性が悪く、且つ測定可能な活性値範囲が狭いという大きな問題点があり、全く使用に耐えないものであった。従って、前記公報に記載されているTT以外の測定項目用乾燥試薬の作製方法を単純にそのまま利用するのでは、使用に耐えるTT測定用の乾燥試薬は作製できないことが判明した。

【0011】本発明が解決しようとする課題は、実用に供することができるTT測定用の血液凝固時間測定乾燥試薬（以下、TT乾燥試薬ともいう）とそれを用いたTT測定法の開発である。

## 【0012】

【課題を解決するための手段】我々は上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねたところ、TT乾燥試薬の凝固時間再現性向上と測定可能な活性値範囲の拡大は、どちらも血液試料を添加した際のTT乾燥試薬の溶解性を向上させることで実現できることを見いだした。

【0013】さらにこの試薬溶解性の向上は、ある特定の添加剤を加えてTT乾燥試薬を作製することにより可能となることが明らかとなり、さらに研究を進めた結果本発明を提案するに至った。

【0014】即ち、本発明は組織トロンボプラスチン、カルシウム塩、牛吸着血漿、磁性粒子、並びに糖類、界面活性剤、アミノ酸、アミノ酸塩、タンパク、及び多価

アルコールよりなる群から選ばれた少なくとも1種の添加剤を含有してなる血液凝固乾燥試薬に関するものである。

【0015】本発明のTT乾燥試薬の調製方法は特に限定されないが、上記必須成分を含む水溶液をTT乾燥試薬用最終溶液として調製した後、反応スライドに一定量分注し、凍結乾燥する方法が一般的である。以下、詳述する。

【0016】TT乾燥試薬用最終溶液を分注する上記反応スライドの材質は、TT測定時、血液試料とTT乾燥試薬からなる反応液の粘度上昇を磁性粒子の運動シグナルの減衰として光学的にモニターできるものであれば特に限定されず、代表的にはポリエステル、ポリ塩化ビニル等が使用される。

【0017】例示すると、図1及び図2に示したような反応スライドが挙げられる。図1は、反応スライドを上方から見た図である。図1の点線で囲んだ部分がTT乾燥試薬用最終溶液分注口と血漿添加口とからなる主要部である。主要部の構造を詳しく示したのが図2である。通常白色のポリエステル板Cに透明色のポリエステル板Bを貼合わせ、次にBの上にさらに透明色のポリエステル板Aを貼合わせることで、主要部を構成する。

【0018】前述のTT乾燥試薬用最終溶液を図1に示す分注口から入れると、Dの部分に該最終溶液が充填される。続いて、凍結乾燥または風乾することにより試薬成分を反応スライド中に保持し、本発明のTT乾燥試薬が作製できる。

【0019】本発明のTT乾燥試薬中の各構成成分の含量は任意に決定すればよいが、以下代表的数値を例示する。尚、以下に述べる各構成成分の含量は、反応スライドに20 $\mu$ lの前記TT乾燥試薬用最終溶液を分注して乾燥した場合の含量で示す。

【0020】本発明でいう組織トロンボプラスチンとは牛脳から抽出された血液凝固因子であり、血液試料の凝固を開始させる成分である。一般に組織トロンボプラスチンは2 $\times 10^{-8}$ ~2 $\times 10^{-3}$ gで使用されるが、凝固反応の進行がより安定する点から2 $\times 10^{-6}$ g~2 $\times 10^{-4}$ gが好適である。

【0021】カルシウム塩は凝固反応に必須のカルシウムイオンの供給源であり、例えば塩化カルシウムや乳酸カルシウム等が具体的に挙げられる。一般に該カルシウム塩は1.1 $\times 10^{-6}$ g~2.2 $\times 10^{-4}$ gで使用されるが、凝固反応の進行がより安定する点から2.2 $\times 10^{-6}$ g~1.1 $\times 10^{-5}$ gが好適である。

【0022】牛吸着血漿は牛血液から遠心処理等で血球を除き、さらに血液凝固第II、VII、IX、X因子を除いて調製したもので、血液凝固第I、V凝固因子等の供給源であり、粉末でも液体でも構わない。血液凝固第II、VII、IX、X因子の除去方法には、例えば硫酸バリウム粉末等で吸着除去する通常の方法を用い

ることができる。一般に牛吸着血漿は8 $\times 10^{-5}$ g~1.5 $\times 10^{-3}$ gで使用されるが、凝固反応の進行がより安定する点から2 $\times 10^{-4}$ g~6 $\times 10^{-4}$ gが好適である。

【0023】磁性粒子はその運動シグナルで反応液の粘度上昇及び低下をモニターするものであり、例えば四三酸化鉄粒子、三二酸化鉄粒子、ニッケル粒子、コバルト粒子等の強磁性体が好適に使用できるが、得られるシグナルの強度が大きく安定している点から四三酸化鉄粒子が特に好ましい。磁性粒子の大きさは一般に平均粒子径10 $\mu$ m以下が使用できるが、得られるシグナルの強度がより大きい点から平均粒子径0.4~0.9 $\mu$ mである粒子が好適に使用できる。磁性粒子の含量は通常2 $\times 10^{-6}$ g~2 $\times 10^{-4}$ gで使用されるが、得られるシグナルの強度がより大きい点から2 $\times 10^{-5}$ g~1.2 $\times 10^{-4}$ gが好適である。

【0024】添加剤はTT乾燥試薬の溶解性を向上させるものであり、糖類、界面活性剤、アミノ酸、アミノ酸塩、タンパク、及び多価アルコールよりなる群から選ばれ、これらは単独または2種以上組み合わせ用いられる。

【0025】糖類としては、グルコース、フルクトース、ショ糖等のオリゴ糖類、デキストラン等の多糖類等が挙げられ、いずれも使用できるが、TT乾燥試薬の溶解性がより良好でかつ安定である点からオリゴ糖類が好適に使用される。該糖類は通常2 $\times 10^{-5}$ g~4 $\times 10^{-3}$ gで使用されるが、TT乾燥試薬の溶解性がより良好でかつ均一である点から1 $\times 10^{-4}$ g~1 $\times 10^{-3}$ gが好適である。

【0026】界面活性剤は、塩化ベンザルコニウム、臭化ウンデシルトリメチルアンモニウム等の陽イオン性界面活性剤、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、3-[(3-Cholanidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)、3-[(3-Cholanidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate (CHAPSO)等の両イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等の非イオン性界面活性剤のいずれも使用できるが、TT乾燥試薬の溶解性がより良好でかつ安定である点から、非イオン性界面活性剤が好適に使用できる。該界面活性剤は通常2 $\times 10^{-5}$ g~2 $\times 10^{-3}$ gで使用されるが、TT乾燥試薬の溶解性がより良好でかつ均一である点から1 $\times 10^{-4}$ g~1 $\times 10^{-3}$ gが好適である。

【0027】アミノ酸又はその塩としては、例えば中性アミノ酸又はその塩としてグリシン、アラニン、グリシン塩酸塩等、酸性アミノ酸又はその塩としてはグルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸ナトリウム等、塩基性アミノ酸又はその塩としては、リジン、リジン塩酸塩、アルギニン等があげられ、いずれも使用できるが、TT乾燥試薬の溶解性がより良好でかつ安定である点か



ら、酸性アミノ酸及び酸性アミノ酸塩が好適に使用できる。該アミノ酸又はその塩は通常  $2 \times 10^{-5} \text{ g} \sim 2 \times 10^{-3} \text{ g}$  で使用されるが、TT乾燥試薬の溶解性がより良好でかつ均一である点から  $1 \times 10^{-4} \text{ g} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ g}$  が好適である。

【0028】タンパクとしては、例えばカゼイン、ゼラチン、牛血清アルブミン（以下BSAと略す）等のいずれも使用できる。該タンパクは通常  $2 \times 10^{-5} \text{ g} \sim 2 \times 10^{-3} \text{ g}$  で使用されるが、TT乾燥試薬の溶解性がより良好でかつ均一である点から  $1 \times 10^{-4} \text{ g} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ g}$  が好適である。

【0029】多価アルコールとしては、例えばグリセロール、ポリエチレングリコール（以下PEGと略す）等が挙げられ、いずれも使用できるが、TT乾燥試薬の溶解性がより良好でかつ安定である点から、PEGが好適に使用でき、なかでも平均分子量5000～10000ものが好適である。該多価アルコールは通常  $2 \times 10^{-5} \text{ g} \sim 2 \times 10^{-3} \text{ g}$  で使用されるが、TT乾燥試薬の溶解性がより良好でかつ均一である点から  $1 \times 10^{-4} \text{ g} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ g}$  が好適である。

【0030】これら添加剤の中でも、特に溶解性が安定し凝固時間の再現性が良好である点から糖類及び多価アルコールが好適である。上記本発明中の添加剤を一切用いない場合、TT乾燥試薬の溶解性が著しく低下し、再現性のある凝固時間が得られないためTTの測定は困難である。

【0031】本発明の血液凝固時間測定乾燥試薬において、組織トロンボプラスチン、カルシウム塩、牛吸着血漿、強磁性体磁性粒子、並びに糖類及び多価アルコールよりなる群から選ばれた少なくとも1種の添加剤を含有してなる血液凝固時間測定乾燥試薬が、血液試料と該試薬との溶解性に優れる結果、得られる磁性粒子の運動シグナル強度が大きく判定が容易でありしかも測定感度が向上する、更に凝固時間の再現性がよい、従来の溶液法との相関性がよい等の種々の点で好ましい試薬である。

【0032】本発明のTT乾燥試薬の調製方法は特に限定されないが、前出の組織トロンボプラスチン、牛吸着血漿及びカルシウム塩を含む市販の乾燥品TT試薬を用いて、この乾燥品TT試薬を水で復元し次いで磁性粒子と添加剤の水溶液を加えて、或は乾燥品TT試薬に直接磁性粒子と添加剤の水溶液を加えてTT乾燥試薬用最終溶液した後、該最終溶液を所定の反応スライドに一定量分注し乾燥する方法が代表的な調製方法である。

【0033】上記復元する際の液、並びに添加剤を溶解させる液としては、通常水を使用するが、pH6～pH8の任意の濃度の緩衝液、例えば20mMトリス緩衝液（pH7.3）、20mMHEPES緩衝液（pH7.3）等を用いてもよい。

【0034】TT乾燥試薬作製時の凍結方法は、液体窒素等で瞬時に凍結する方法あるいは緩慢に凍結する方法

のどちらでも構わないが、TT乾燥試薬の溶解性がより良好でかつ均一である点から、緩慢に凍結する方法が好適である。凍結方法を例示すると、所定の反応スライドにTT乾燥試薬用最終溶液を室温で一定量分注した後、 $-40^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に入れ、緩慢に凍結する方法が使用できる。

【0035】乾燥方法は、凍結乾燥あるいは風乾のどちらでも構わないが、TT乾燥試薬の溶解性がより均一である点から、凍結乾燥が好適である。凍結乾燥方法を例示すると、真空状態で温度を $-30^{\circ}\text{C}$ から $30^{\circ}\text{C}$ まで8時間で上昇させて凍結乾燥する方法が使用できる。

【0036】本発明のTT乾燥試薬でのTTの測定は特に限定されないが、代表的にはTT乾燥試薬に一定量の血液試料を滴下し、すぐに振動磁場と静止磁場の組合せにかけて磁性粒子を運動させ、同時にTT乾燥試薬中に含まれる磁性粒子の運動シグナルを光学的にモニターして凝固を検知する方法で行うことができる。このような測定は、市販の血液凝固時間測定装置である商品名COAG1〔和光純薬工業（株）販売〕や商品名CG-01〔（株）A&T販売〕等を使用して行うことができる。

【0037】上記の方法でTTを測定するとき、通常TT凝固時間とは血液試料を添加してから凝固点までの時間を指す。凝固点はTT乾燥試薬中の磁性粒子の運動シグナルの強度変化をもとに判断することができる。凝固点としては、シグナル強度の減衰速度が最大になる点、或はシグナル強度がその最大値に対して任意の割合まで減衰した点等が採用される。得られる凝固時間の再現性がより良好であることから、シグナル強度の減衰速度が最大になる点が好適に使用できる。

【0038】経口抗凝血漿投与効果を評価する場合、TT活性値を使用することもある。TT活性値は、TT凝固時間の機種間差をなくす標準化のために使用されるものである。

【0039】本発明のTT乾燥試薬を用いて任意の血液試料のTT活性値を求める方法は、標準曲線を利用して、得られたTT凝固時間から算出する一般的な方法が使用できる。標準曲線の作成方法は特に限定されないが、例えばTT活性値既知の血液試料を任意に5段階に希釈し、両対数グラフの縦軸を凝固時間とし、横軸をTT活性値として作成する方法が好適に使用できる。

【0040】本発明により試薬溶解性が向上した結果、初めて実用に適したTT測定用のTT乾燥試薬が提供可能となった。従って、緊急性の高いTT測定に最適な、試薬溶液の調製等が必要ない測定法が可能となった。

【0041】

【実施例】

実施例1 添加剤を含むTT乾燥試薬の再現性

TT乾燥試薬の製造は以下のようにして行った。市販のTT試薬である複合因子Tコクサイ〔（株）国際試薬；



牛脳由来組織トロンボラスチン、牛吸着血漿及び乳酸カルシウムを含む〕を取扱い説明書に従って調製して水溶液とする際、水に代えてグルコースの最終濃度が1重量%となるように調製されたグルコース水溶液を添加した。さらに $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 粒子(レアメトリック社製)を最終濃度 $5\text{mg/ml}$ となるように添加してTT乾燥試薬用最終溶液を作成し、よく振とう攪拌した。該最終溶液を、図1に示す反応スライドに $20\mu\text{l}$ ずつ分注し、 $-40^\circ\text{C}$ の冷凍庫で凍結し、続いて凍結乾燥を行った。凍結乾燥は、真空状態で $-30^\circ\text{C}$ から7時間で $20^\circ\text{C}$ まで直線的に温度を上昇させる方法で行った。

【0042】TT乾燥試薬を用いたTTの測定は以下のようにして行った。試料として用いたサイトロールI(正常モデル血漿、デイド・バクスター社製)は、取扱い書に指示された通りに調製した後、オーレンペロナール緩衝液(シグマ社製)を等量加えて1/2濃度に希釈し、TT乾燥試薬1枚につき $25\mu\text{l}$ を測定に用いた。凍結乾燥後 $4^\circ\text{C}$ にて保存しておいたTT乾燥試薬はデシケータ中にて室温になるまで放置し、CG01〔(株)A&T販売〕を用いて以下に述べる凝固時間を2回測定した。試料添加後の磁性粒子の運動を散乱光の変化として測定すると、このシグナルの強度は凝固に伴う粘度の増加に従い急激に小さくなる。試料添加直後から、図3に示したようにこのシグナル強度の減衰速度が最大となる変曲点を凝固点とし、試料を添加してからこの凝固点までを凝固時間とし、結果を表1に示した。また、シグナル強度最大値も表1に示した。TT乾燥試薬の溶解性が高ければ、シグナル強度の最大値は大きくなる。

【0043】表1より、上記のグルコースを添加したTT乾燥試薬では2回測定した場合の再現性がよく、TT測定への使用に適することがわかる。また、シグナル強度最大値が大きく試薬が十分に溶解していることがわかる。

【0044】実施例2 添加剤を含むTT乾燥試薬の再現性

実施例1と同様の方法で、TT乾燥試薬用最終溶液調製時にグルコース水溶液に代えて非イオン性界面活性剤であるポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート水溶液を添加し、TT乾燥試薬の製造を行った。作製したTT乾燥試薬によるTT測定も実施例1と同様に行い、その結果を表1に示した。

【0045】表1より、上記のポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートを添加したTT乾燥試薬では2回測定した場合の再現性がよく、TT測定への使用に適することがわかる。またシグナル強度最大値が大きく試薬が十分に溶解していることがわかる。

【0046】実施例3 添加剤を含むTT乾燥試薬の再現性

実施例1と同様の方法で、TT乾燥試薬用最終溶液作製

時にグルコース水溶液に代えてグルタミン酸ナトリウム水溶液を添加し、TT乾燥試薬の製造を行った。作製したTT乾燥試薬によるTT測定も実施例1と同様に行い、その結果を表1に示した。

【0047】表1より、上記のグルタミン酸ナトリウムを添加したTT乾燥試薬では2回測定した場合の再現性がよく、TT測定への使用に適することがわかる。またシグナル強度最大値が大きく試薬が十分に溶解していることがわかる。

10 【0048】実施例4 添加剤を含むTT乾燥試薬の再現性

実施例1と同様の方法で、TT乾燥試薬用最終溶液作製時にグルコース水溶液に代えてBSA水溶液を添加し、TT乾燥試薬の製造を行った。作製したTT乾燥試薬によるTT測定も実施例1と同様に行い、その結果を表1に示した。

【0049】表1より、上記のBSAを添加したTT乾燥試薬では2回測定した場合の再現性がよく、TT測定への使用に適することがわかる。またシグナル強度最大値が大きく試薬が十分に溶解していることがわかる。

20 【0050】実施例5 添加剤を含むTT乾燥試薬の再現性

実施例1と同様の方法で、TT乾燥試薬用最終溶液作製時にグルコース水溶液に代えてPEG6000(和光純薬製;平均分子量7500)水溶液を添加し、TT乾燥試薬の製造を行った。作製したTT乾燥試薬によるTT測定も実施例1と同様に行い、その結果を表1に示した。

30 【0051】表1より、上記のPEG6000を添加したTT乾燥試薬では2回測定した場合の再現性が最もよく、TT測定への使用に適することがわかる。またシグナル強度最大値が大きく試薬が十分に溶解していることがわかる。

【0052】比較例1 添加剤を含まないTT乾燥試薬の再現性

実施例1と同様の方法で、但しTT乾燥試薬用最終溶液作製時に添加剤を全く加えず、TT乾燥試薬の製造を行った。作製したTT乾燥試薬によるTT測定も実施例1と同様に行い、その結果を表1に示した。

40 【0053】表1より、上記の添加剤を全く加えないTT乾燥試薬では2回測定した場合の再現性が著しく劣っていることがわかる。またシグナル強度最大値が非常に小さく試薬がほとんど溶解していないことがわかる。以上の結果より、本発明の添加剤を使用せずにTT乾燥試薬を作成した場合、TTの測定に使用するのは困難であり、添加剤を使用して初めてTTの測定に使用可能な凝固時間の再現性を示すことがわかる。

【0054】

【表1】

	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5	比較例 1
凝固時間 1 回目	72.0 (秒)	78.0	73.0	70.5	84.5	54.5
凝固時間 2 回目	70.0 (秒)	79.0	71.0	68.5	84.0	67.0
最大シグ ナル強度	5050	4800	6200	4250	5400	730

#### 【0055】実施例6 T T 活性標準曲線

添加剤としてPEG6000を使用して実施例1と同様にT T 乾燥試薬を製造した。測定試料はヒト標準血漿〔(株)国際試薬、トロンボテスト活性110%〕を希釈液でT T 活性11、22、55、82.5%の希釈血漿とし、各T T 活性の凝固時間を測定した。希釈液はB SA 5%、シュクロース10%、塩化ナトリウム0.9%を含む水溶液を用いた。測定結果は図4に示した。

【0056】測定結果より、図4のように両対数グラフ上で良好な標準曲線が得られた。従って、本発明の試薬を用いた場合標準曲線を求めることで、凝固時間からT T 活性値を算出できることがわかる。

#### 【0057】実施例7 因子感受性試験

添加剤としてPEG6000を使用して実施例1と同様にT T 乾燥試薬を製造し、血液凝固第X因子感受性を調べた。測定試料は正常血漿及び血液凝固第X因子欠乏血漿(ジョージキング社)を用いて作製した。正常血漿を因子含有率100%とし、因子欠乏血漿を因子含有率0%として因子含有率5、10、20、50、75%となるように2種の血漿を混合して用いた。測定結果は図5に示した。

【0058】図5より、本発明の試薬は血液凝固第X因子に対して十分な感受性を持つことがわかる。

#### 【0059】実施例8 従来法との相関

添加剤としてPEG6000を使用して実施例1と同様にT T 乾燥試薬を製造し、測定試料にヒト血漿38検体を用いて従来法との相関を調べた。従来法の測定は、T T 試薬としてトロンボテストオーレン(エーザイ)を、測定装置としてKC-10(アメルンク社)を各々の取扱説明書に従って使用した。測定結果は図6に示した。

【0060】本発明のT T 測定用のT T 乾燥試薬を用いた測定法と従来法の関係は測定結果より $Y = 17.4 + 1.45X$ と表すことができ、このときの相関係数は0.9903であった。従って、本発明のT T 乾燥試薬を用いたT T 測定法は、従来のT T 測定法と非常に良好な相関関係を持つことがわかる。

#### 【0061】実施例9 従来法との相関

グルコース水溶液に代えて最終濃度が10重量%になるように調製されたショ糖水溶液を使用し、実施例1と同様にしてT T 乾燥試薬を製造し、測定試料にヒト血漿28検体を用いて従来法との相関を調べた。従来法の測定

\*は、T T 試薬としてトロンボテストオーレン(エーザイ)を、測定装置としてKC-10(アメルンク社)を各々の取扱説明書に従って使用した。測定結果は図7に示した。

【0062】本発明のT T 測定用のT T 乾燥試薬を用いた測定法と従来法の関係は測定結果より $Y = -7.954 + 1.653X$ と表すことができ、このときの相関係数は0.9900であった。従って、本発明のT T 乾燥試薬を用いたT T 測定法は、従来のT T 測定法と非常に良好な相関関係を持つことがわかる。

#### 【0063】

20 【発明の効果】本発明により、血液試料を滴下した際のトロンボテスト測定用のT T 乾燥試薬の溶解性が向上した。この結果、凝固時間の同時再現性が向上し、得られる磁性粒子の運動シグナル強度が大きくなり判定が容易となり且つ測定感度が向上し、しかも、従来の溶液法との相関性がよい等の種々の点で優れたT T 乾燥試薬が得られるようになった。

【0064】従って、実用に適したT T 乾燥試薬の提供が可能になり、手術等で抗凝固剤を投与する際に患者血液の凝固能力のモニタリングを迅速に行うことができ

30 る。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、T T 乾燥試薬用反応スライドの1例の概観図である。

【図2】 図2は、T T 乾燥試薬用反応スライドの1例の主要部の構成図である。

【図3】 図3は、T T 乾燥試薬に血液試料を添加した場合のシグナル強度の変化である。

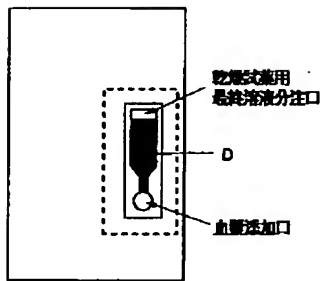
【図4】 図4は、実施例6におけるT T 活性の標準曲線で、縦軸(対数)が凝固時間、横軸(対数)がT T 活性値である。

【図5】 図5は、実施例7における血液凝固第X因子感受性のグラフで、縦軸(対数)が凝固時間、横軸(対数)が因子含有率である。

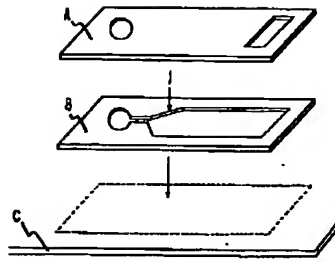
【図6】 図6は、実施例8における本法と従来法の相関グラフで、縦軸が本法の凝固時間、横軸が従来法の凝固時間である。

【図7】 図7は、実施例9における本法と従来法の相関グラフで、縦軸が本法の凝固時間、横軸が従来法の凝固時間である。

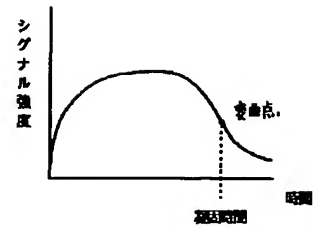
【図1】



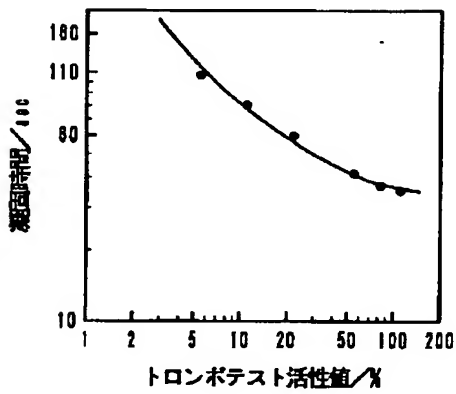
【図2】



【図3】

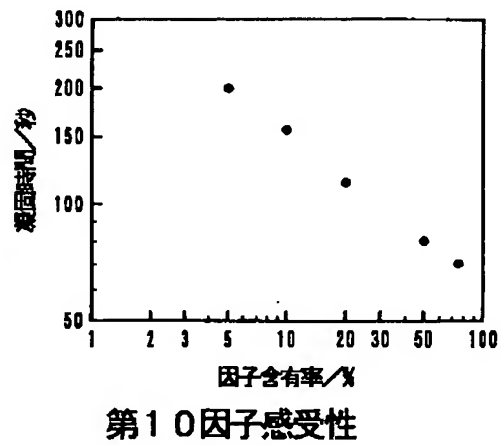


【図4】

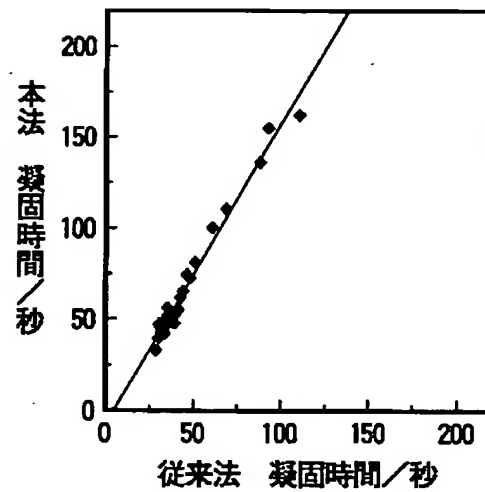


トロンボテスト標準曲線

【図5】



【図7】



【図6】

